

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-257890
(43)Date of publication of application : 29.09.1998

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C07H 21/04
C12N 1/21
C12N 9/80
// (C12N 15/09)
C12R 1:06)
(C12N 1/21)
C12R 1:19)
(C12N 9/80)
C12R 1:06)
(C12N 9/80)
C12R 1:19)

(21) Application number : 09-021382

(22) Date of filing : 04.02.1997

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(72)Inventor : TODA ATSUSHI
NISHIYA YOSHIAKI
KAWAMURA YOSHIHISA

(54) NEW CREATINE AMIDINOHYDROLASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new enzyme, comprising a creatine amidinohydrolase capable of decomposing creatine into sarcosine and urea in the presence of water, available in a large amount in high purity according to a genetic engineering technique and

useful for determination, etc., of creatine and creatinine. **SOLUTION:** This creatine amidinohydrolase has actions on creatine in the presence of water and production of sarcosine and urea, about 7.0–8.5 optimum pH, is stable at about $\leq 40^\circ$ C (by treatment at pH7.5 for 30min) and has the pH stability of about 5.0–9.0 (by treatment at 25° C for 16hr), about 46mM value of K_m for the creatine and a molecular weight of about 50,000 [measured by a sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)], 47,146 (a calculated value from the amino acid composition) and about 78,000 (measured by a gel filtration) and further about 4.3 isoelectric point and is represented by the formula. The creatine amidinohydrolase is used for the determination, etc., of the creatine and creatinine. The enzyme is obtained from chromosomal DNA of *Arthrobacter* sp. TE1826.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of

[rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

Claim 1 (page 2, left column, lines 2-15)

Claim 1. A novel creatine amidinohydrolase having the following physicochemical properties:

Action: acting on creatine in the presence of water to produce sarcosine and urea

Optimal temperature: about 40°C

Optimal pH: about 7.0-8.5

Heat stability: about 40°C or below (treated at pH 7.5 for 30 min)

pH stability: about 5.0-9.0 (treated at 25°C for 16 hr)

K_m value for creatine: about 46 mM

Molecular weight: about 50,000 (SDS-PAGE)

47,146 (calculated from amino acid composition)
about 78,000 (gel filtration)

Isoelectric point: about 4.3

page 3, left column, lines 2-12

[0005]

[means of solving the problem] The present inventors have investigated variously in an attempt to solve the above object, and selected *Arthrobacter sp.* TE1826 (FERM P-10637) as a creatine amidinohydrolase-producing bacterial strain, and isolated a novel creatine amidinohydrolase from said bacterial strain. Additionally, the present inventors have isolated a recombinant creatine amidinohydrolase expressed from a gene encoding a creatine amidinohydrolase by successively separating said gene from chromosomal DNA extracted from said bacterial strain.

page 3, left column, lines 17-30

[0006] Accordingly, the present invention relates to a novel creatine amidinohydrolase having the following physicochemical properties:

Action: acting on creatine in the presence of water to produce sarcosine

and urea

Optimal temperature: about 40°C

Optimal pH: about 7.0-8.5

Heat stability: about 40°C or below (treated at pH 7.5 for 30 min)

pH stability: about 5.0-9.0 (treated at 25°C for 16 hr)

K_m value for creatine: about 46 mM

Molecular weight: about 50,000 (SDS-PAGE)

47,146 (calculated from amino acid composition)

about 78,000 (gel filtration)

Isoelectric point: about 4.3

page 5, right column, lines 25-38

[0030] The creatine amidinohydrolase of the present invention has the following physicochemical properties:

Action: acting on creatine in the presence of water to produce sarcosine and urea

Optimal temperature: about 40°C

Optimal pH: about 7.0-8.5

Heat stability: about 40°C or below (treated at pH 7.5 for 30 min)

pH stability: about 5.0-9.0 (treated at 25°C for 16 hr)

K_m value for creatine: about 46 mM

Molecular weight: about 50,000 (SDS-PAGE)

47,146 (calculated from amino acid composition)

about 78,000 (gel filtration)

Isoelectric point: about 4.3

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-257890

(43) 公開日 平成10年(1998)9月29日

(51) Int.Cl.[®] 認別記号
 C 1 2 N 15/09 Z N A
 C 0 7 H 21/04
 C 1 2 N 1/21
 9/80
 // (C 1 2 N 15/09 Z N A

F I
C 1 2 N 15/00 Z NAA
C 0 7 H 21/04 B
C 1 2 N 1/21
9/80 A

審査請求 未請求 請求項の数10 OL (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-21382
(22) 出願日 平成9年(1997)2月4日

(71) 出願人 000003160
東洋紡績株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 戸田 篤志
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 西矢 芳昭
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 川村 良久
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(54) 【発明の名称】 新規なクレアチニアミジノヒドロラーゼ

(57)【要約】 (修正有)

【課題】クレアチン及びクレアチニンの定量に用いることのできるクレアチナミジノヒドロラーゼ活性を有する新規な酵素、並びに該酵素をコードする遺伝子および遺伝子工学的技術による該酵素の製造法を提供する。

【解決手段】 至適温度約40°C、至適pH約7.0～8.5、熱安定性約40°C以下、pH安定性約5.0～9.0であり、かつ、Km値が約4.6 mMであるアースロバクター属細菌由来のクレアチニアミジノヒドロラーゼおよび該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターで形質転換した形質転換体、並びに該形質転換体を培養し、クレアチニアミジノヒドロラーゼを生成させ、該酵素を採取する製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記理化学的性質を有する新規なクレアチニアミジノヒドロラーゼ。

作用：水の存在下にクレアチニンに作用して、ザルコシンおよび尿素を生成する。

至適温度：約40°C

至適pH：約7.0～8.5

熱安定性：約40°C以下 (pH 7.5, 30分間処理)

pH安定性：約5.0～9.0 (25°C, 16時間処理)

クレアチニンに対するKm値：約4.6 mM

分子量：約50,000 (SDS-PAGE)

47,146 (アミノ酸組成から求めた計算値)

約78,000 (ゲル通過)

等電点：約4.3

【請求項2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質であるクレアチニアミジノヒドロラーゼ。

(a) 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、クレアチニアミジノヒドロラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項3】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有する請求項1記載のクレアチニアミジノヒドロラーゼ。

【請求項4】 以下の(a)又は(b)のタンパク質であるクレアチニアミジノヒドロラーゼをコードする遺伝子。

(a) 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、クレアチニアミジノヒドロラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項5】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるクレアチニアミジノヒドロラーゼをコードする遺伝子。

【請求項6】 以下の(c)、(d)または(e)のDNAからなるクレアチニアミジノヒドロラーゼをコードする遺伝子。

(c) 配列表の配列番号2に記載される塩基配列からDNA

(d) 上記(c)の塩基配列において、1もしくは複数の塩基が付加、欠失または置換されており、かつ、クレアチニアミジノヒドロラーゼ活性を有するアミノ酸配列をコードしているDNA

(e) 上記(c)の塩基配列からなるDNAとストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、かつ、クレアチニアミジノヒドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

する細菌由来のDNA

【請求項7】 請求項4、5または6記載のクレアチニアミジノヒドロラーゼをコードする遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項8】 請求項7記載の組換えベクターで宿主細胞を形質転換した形質転換体。

【請求項9】 請求項8記載の形質転換体を培養し、クレアチニアミジノヒドロラーゼを生成させ、該クレアチニアミジノヒドロラーゼを採取することを特徴とするクレアチニアミジノヒドロラーゼの製造法。

【請求項10】 アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) TE 1826 (FERM P-10637) を培養し、クレアチニアミジノヒドロラーゼを生成させ、該クレアチニアミジノヒドロラーゼを採取することを特徴とするクレアチニアミジノヒドロラーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はクレアチニンおよびクレアチニンの定量に用いることのできるクレアチニアミジノヒドロラーゼ活性を有する新規な酵素、ならびに該酵素をコードする遺伝子および遺伝子工学的技術による該酵素の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来から、クレアチニアミジノヒドロラーゼ (EC 3.5.3.3) は、臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチニンおよびクレアチニンの測定用酵素として、他の酵素、例えばクレアチニアミドヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびペルオキシダーゼと共に使用されている。クレアチニアミジノヒドロラーゼは、水の存在下にクレアチニンに作用して、ザルコシンと尿素を生成する反応を触媒する酵素である。

【0003】 このようなクレアチニアミジノヒドロラーゼは、シュードモナス属 (Journal of Biochemistry, Vol. 1.79, 1381-1383 (1976)) あるいはパチルス属 (特公昭61-17465) 等の細菌が生産することが知られている。さらに、これら以外の細菌としては、フラボバクテリウム属、コリネバクテリウム属、マイクロコッカス属 (特開昭51-11884号公報)、アルカリゲネス属、ベニシリウム属 (特開昭47-43281号公報) などの細菌が知られているに過ぎない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、今までに生産していない新しい細菌から、新規なクレアチニアミジノヒドロラーゼを単離し、そして、該酵素をコードする遺伝子をクローニングし、遺伝子工学的に該酵素を多量に製造する方法を提供することにある。また、本発明の別な目的は、該遺伝子を変更することにより、理

50 化学的性質の改良された新規なクレアチニアミジノヒド

(PCR)の利用により、クレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子を含むDNA断片を得ることも可能である。

【0016】上記遺伝子としては、例えば、(a)配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、または(b)アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、クレアチニアミジノヒドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAがある。DNAの欠失、置換、付加の程度については、基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善するようにしたものを含む。これらの変異体を製造する方法は、従来から公知である方法に従う。

【0017】または、(c)配列表の配列番号2に記載される塩基配列からDNA、(d)(c)の塩基配列において1もしくは数個の塩基が付加、欠失または置換されており、かつクレアチニアミジノヒドロラーゼ活性を有するアミノ酸配列をコードしているDNAまたは(e)(c)の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、クレアチニアミジノヒドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードする細菌由来のDNAがある。ここで、ストリンジェントな条件とは×2SSC(300mM NaCl、30mM クエン酸)、65°C、16時間である。

【0018】本発明の遺伝子を得る方法としては、例えば、アースロバクター・エスピー(Arthrobacter sp.)TE1826(FERM P-10637)の染色体DNAを分離、精製した後、超音波破碎、制限酵素処理等を用いてDNAを切断したものと、リニヤーな発現ベクターとを両DNAの平滑末端または接着末端においてDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。こうして得られた組換えベクターは複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカーと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、クレアチニアミジノヒドロラーゼをコードする遺伝子を含有する組換えベクターを保持する微生物を得る。次いで該微生物を培養し、該培養菌体から該組換えベクターを分離・精製し、該組換えベクターからクレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子を採取すれば良い。

【0019】遺伝子供与体であるアースロバクター・エスピー(Arthrobacter sp.)TE1826(FERM P-10637)の染色体DNAは、具体的には、以下のように採取される。すなわち、供与微生物を例えば、1~3日間搅拌培養して得られた培養物を遠心分離にて集菌し、次いでこれを溶菌させることによりクレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えば、リゾチームやβ-グルカナーゼ等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム(SDS)等の界面活性剤が併用され、さらに凍結

融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせても良い。

【0020】このようにして得られた溶菌物からDNAを分離・精製するには、常法に従って、例えばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈澱処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。微生物から分離・精製されたDNAを切断する方法は、例えば、超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。

10 好ましくは、特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。

【0021】ベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えば、エシェリヒア・コリー(Escherichia coli)を宿主微生物とする場合には、Lambda- λ 10、Lambda- λ 11などが使用できる。またプラスミドとしては、例えばエシェリヒア・コリー(Escherichia coli)を宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC19、

20 pBluescript、pLED-M1(Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.76, 265-269 (1993))などが使用できる。このようなベクターを、上述したクレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素を用いる必要はない。微生物DNA断片とベクターDNA断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であれば良く、例えば微生物DNA断片の接着末端とベクター

30 断片の接着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作成する。必要なら、アニーリングの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用し組換えベクターを作成することもできる。

【0022】宿主微生物としては、組換えベクターが安定、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるものであれば良く、一般的にはエシェリヒア・コリーW3110、エシェリヒア・コリーC600、エシェリヒア・コリーHB101、エシェリヒア・コリーJM109などを用いることができる。

【0023】宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリーの場合には、カルシウム処理によるコンビテントセル法やエレクトロポレーション法などが用いることができる。

【0024】このようにして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のクレアチニアミジノヒドロラーゼを安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとクレアチニアミジノヒドロラーゼ活性を

同時に発現する微生物を検索すれば良く、例えば薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつ、クレアチニアミジノヒドロラーゼを生成する微生物を選択すれば良い。

【0025】上記の方法により得られたクレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列はサイエンス (Science, Vol.214, 1205-1210 (1981)) に記載されたジオキシン法により解読し、またクレアチニアミジノヒドロラーゼのアミノ酸配列は決定した塩基配列より推定した。このようにして一度選択されたクレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子を保有する組換えベクターは、形質転換微生物から取り出され、他の微生物に移入することも容易に実施することができる。また、クレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCRによりクレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させ、宿主微生物に移入することも容易に実施できる。

【0026】形質転換体である宿主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常、多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては、資化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、ビルピン酸などが使用される。窒素源としては、利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。培養温度は菌が発育し、クレアチニアミジノヒドロラーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリーの場合、好ましくは20~42°C程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、クレアチニアミジノヒドロラーゼが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は6~48時間程度である。培地pHは菌が発育し、クレアチニアミジノヒドロラーゼを生産する範囲で、適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0~9.0程度である。

【0027】培養物中のクレアチニアミジノヒドロラーゼを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従ってクレアチニアミジノヒドロラーゼが培養液中に存在する場合は、濾過、遠心分離などにより、クレアチニアミジノヒドロラーゼ含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。クレアチニアミジノヒドロラーゼが菌体内に存在する場合には、得られた培養物から濾過または遠心分離な

どの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加してクレアチニアミジノヒドロラーゼを可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0028】このようにして得られたクレアチニアミジノヒドロラーゼ含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、精製されたクレアチニアミジノヒドロラーゼを得ることができる。

【0029】例えば、セファデックス (Sephadex) G-25 (ファルマシアバイオテク) などによるゲルろ過、DEAEセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク)、オクチルセファロースCL6-B (ファルマシアバイオテク) カラムクロマトグラフィーにより分離・精製し精製酵素標品を得ることができる。この精製酵素標品は、電気泳動 (SDS-PAGE) 的に、ほぼ単一のバンドを示す程度に純化されている。

【0030】本発明のクレアチニアミジノヒドロラーゼは、以下に示す理化学的性質を有する。

作用：水の存在下にクレアチニンに作用して、ザルコシンおよび尿素を生成する。

至適温度：約40°C

至適pH：約7.0~8.5

熱安定性：約40°C以下 (pH 7.5: 30分間処理)

pH安定性：約5.0~9.0 (25°C, 16時間処理)

クレアチニンに対するKm値：約46mM

分子量：約50,000 (SDS-PAGE)

47,146 (アミノ酸組成から求めた計算値)

約78,000 (ゲルろ過)

等電点：約4.3

【0031】本発明のクレアチニアミジノヒドロラーゼと公知のクレアチニアミジノヒドロラーゼとの性質の比較を表1に示す。また、本発明のクレアチニアミジノヒドロラーゼのアミノ酸配列と公知であるシードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) が产生するクレアチニアミジノヒドロラーゼのアミノ酸配列との相同性は、63.4%であり、両者の比較を図1に示す。本発明のクレアチニアミジノヒドロラーゼは、同一反応を触媒する公知の酵素とは性質の異なる新規な酵素である。

【0032】

【表1】

由来	Arthrobacter sp. TB1826	Pseudomonas putida var. naraensis C-83	Bacillus sp. B-0618
至適温度	40°C	-	40°C
至適pH	7.0~8.5	8.0	7.5~9.0
熱安定性	40°C以下 (pH7.5, 30分間)	45°C以下 (pH7.4, 30分間)	40°C以下 (pH7.5, 10分間)
pH安定性	5.0~9.0	6.0~8.0	6.0~9.0
クレアチンに 対するKm	4.6	-	-
分子量 (SDS-PAGE)	50,000 2	47,000 2	-
サブ ユニット	-	-	-
等電点	4.3	4.7	4.9

【0033】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。実施例中、クレアチニアミジノヒドロラーゼ活性の測定は以下の試薬および測定条件で行った。

<試薬>

試薬混液組成

0.3M HEPES pH 7.6

1.8% クレアチニン

0.015% フェノール

0.005% 4-アミノアンチビリン

6U/m1 ザルコシンオキシダーゼ

6U/m1 ベルオキシダーゼ

【0034】<測定条件>上記試薬混液3m1を37°Cで約3分予備加温後、0.1m1の酵素溶液を加え、37°Cで反応を開始し、4分間反応させた後、500nmにおける1分間当たりの吸光度変化を分光光度計にて測定する。盲検は、酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下、同様に吸光度変化を測定する。上記条件で1分間に1マイクロモルのザルコシンを生成する酵素量を1単位(U)とする。

【0035】実施例1 染色体DNAの分離

アースロバクター・エスピーテ1826(FERM P-10637)の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を100m1の2×YT培地(1.6%ポリベプトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH7.2))で37°Cで、一晩振盪培養した後、遠心分離(8,000rpm、10分間)により集菌した。15mMクエン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウムを含んだ溶液で菌体を洗浄した後、20%シュークロース、50mMトリス塩酸(pH7.6)、1mM EDTAを含んだ溶液5m1に懸濁し、1m1のリゾチーム溶液(100mg/ml)を加えて、37°C、30分間保温し、次いで11m1の1%ラウロイルサルコシン酸、0.1MEDTA(pH9.6)を含む溶液を加えた。この懸濁液に臭化エチジウム溶液を0.5%塩化セシウムを約100%加え、攪拌混合し、

55,000rpm、20時間の超遠心分離でDNAを分取した。分取したDNAは1mM EDTAを含んだ10mMトリス塩酸、pH8.0溶液(以下、TEと略記)で透析し、精製DNA標品とした。これを等量のクロロホ

ルム・フェノール溶液で処理後遠心分離により水層を分取し、2倍量のエタノールを加えて上記方法で、もう一度DNAを分離し、2m1のTEで溶解した。

【0036】実施例2 クレアチニアミジノヒドロラーゼをコードする遺伝子を含有するDNA断片及び該DNA断片を有する組換えベクターの調製

実施例1で得たDNA 5μgを制限酵素 Sau3AI(東洋紡製)で部分分解し、2kb以上の大断片に分解した後、制限酵素 BamHI(東洋紡製)で切断したpBluescriptKS(+) 1μgとをT4-DNAリガーゼ(東洋紡製)

1単位で、16°C、12時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリーJM109のコンビテントセル(東洋紡製)を用いて形質転換し、クレアチニアミジノヒドロラーゼ活性検出用寒天培地[1.0%ポリベプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1%クレアチニン、10U/m1ザルコシンオキシダーゼ(東洋紡製)、5U/m1ベルオキシダーゼ(東洋紡製)、0.01%o-ジアニシジン、50μg/mlアンビシリン、1.5%寒天]に塗布した。クレアチニアミジノヒドロラーゼ活性の検出は、上記培地に生育し、かつ茶色に染色されるコロニーを指標に行った。

【0037】使用したDNA 1μg当たり約100,000個の形質転換体のコロニーが得られ、上記スクリーニングの結果、茶色に染色されるコロニーを1株を見いだした。この株をLB液体培地(1%ポリベプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、50μg/mlアンビシリン)で培養し、クレアチニアミジノヒドロラーゼ活性を測定したところ、該活性が検出された。この株の保有するプラスミドには約6.6kbの挿入DNA断片が存在しており、このプラスミドをpCNAB1とした。

【0038】次いでpCNAB1の挿入DNAを制限酵

50

素 ApaI (東洋紡製) にて切り出し、同制限酵素で切断した pBluescriptKS(+) に連結して、pCNHAA-1 を作成した。この pCNHAA-1 の制限酵素地図を図 2 に示す。

【0039】実施例3 塩基配列の決定

pCNHAA-1 の約 4.6 kb p の挿入DNA断片について種々の制限酵素にてサブクローンを調製した。種々のサブクローンは常法に従い、Radioactive Sequencing Kit (東洋紡製) を用いて、塩基配列を決定した。決定した塩基配列およびアミノ酸配列を配列表に示した。*10

<反応液組成>

Pfu DNA ポリメラーゼ (ストラタジーン製)	5U/100 μl
10倍濃度Pfu DNA ポリメラーゼ用バッファー	10μl/100 μl
pCNHAA-1 (錆型DNA)	0.1 μg/100 μl
dATP, dTTP, dGTP, dCTP	各 0.2mM
2種のプライマー	各 1 μM

(配列表の配列番号 3, 4 に記載)

【0041】<増幅条件>

変性 95°C, 30 秒間

温度変更 1 分 30 秒間

アニーリング 45°C, 1 秒間

温度変更 1 秒間

反応 75°C, 2 分 30 秒間

温度変更 1 秒間

(上記サイクルを合計 30 サイクル実施)

【0042】 増幅DNA断片約 1.2 kb p を、制限酵素 EcoRI で切断した pBluescript SK(-) に連結して pCRHAR-1 を作成した。pCRHAR-1 の制限酵素地図を図 3 に示す。pCRHAR-1 の挿入DNA断片は、クレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子以外の部分を含まない。

【0043】実施例5 形質転換体の作成

エシェリヒア・コリー JM109 のコンピメントセル (東洋紡製) を pCRHAR-1 で形質転換し、形質転換体エシェリヒア・コリー JM109(pCRHAR-1) を得た。

【0044】実施例6 エシェリヒア・コリー JM109(pCRHAR-1) からのクレアチニアミジノヒドロラーゼの製造 LB 培地 500 ml を 2 L フラスコに分注し、121°C、15 分間オートクレーブを行い、放冷後、別途、無菌ろ過した 50 mg/m1 アンビシリン (ナカライトスク製) 0.5 ml を添加した。この培地に LB 培地であらかじめ、30°C、7 時間振盪培養したエシェリヒア・コリー JM109(pCRHAR-1) の培養液 5 ml を接種し、37°C で 18 時間通気攪拌培養した。培養終了時のクレアチニアミジノヒドロラーゼ活性は約 5 U/m1 であった。

【0045】 上記菌体を遠心分離にて集菌し、20 mM リン酸緩衝液、pH 7.5 に懸濁した。上記菌体懸濁液をフレンチプレスで破碎し、遠心分離を行い上清液を得た。得られた粗酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理および硫安分画処理を行った後、セファデックス

* アミノ酸配列から求められる蛋白質の分子量は 47,146 であり、アースロバクター・エスピー TE 1826 のクレアチニアミジノヒドロラーゼの分子量とほぼ一致した。

【0040】実施例4 組換えベクター pCRHAR-1 の作成

pCNHAA-1 の挿入DNA断片よりクレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子以外の部分を除くため、PCR による挿入DNA断片の小型化を実施した。PCR は以下に示す反応液組成及び増幅条件にて行った。

20 (Sephadex) G-25 (ファルマシア バイオテク) によるゲルろ過により脱塩し、DEAEセファロース CL-6B (ファルマシア バイオテク) カラムクロマトグラフィー、オクチルセファロース CL-6B (ファルマシア バイオテク) カラムクロマトグラフィーにより分離・精製し、精製酵素商品を得た。該方法により得られたクレアチニアミジノヒドロラーゼ標品は、電気泳動 (SDS-PAGE) 的にほぼ単一なバンドを示し、この時の比活性は約 21 U/mg - タンパク質であった。

25 【0046】以下に、上記方法により得られたクレアチニアミジノヒドロラーゼの性質を示す。

作用：クレアチニンに水の存在下に作用して、ザルコシン 30 や尿素を生成する。

至適温度：約 40°C

至適 pH：約 7.0 ~ 8.5

熱安定性：約 40°C 以下 (pH 7.5 : 30 分間処理)

pH 安定性：約 5.0 ~ 9.0 (25°C, 16 時間処理)

クレアチニンに対する Km 値：約 4.6 mM

分子量：約 50,000 (SDS-PAGE)

47,146 (アミノ酸組成から求めた計算値)

約 78,000 (ゲルろ過)

40 等電点：約 4.3

【0047】実施例7

アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) TE 1826 (FERM P-10637) を 2XYT 培地 (1.6% ポリベプトン、1% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、pH 7.2) にて、37°C、約 1~3 日間、培養し、培養液を遠心分離して集菌し、次いでこれを溶菌させることによって、クレアチニアミジノヒドロラーゼを生成させ、該クレアチニアミジノヒドロラーゼを採取した。

【0048】

50 【発明の効果】本発明により、アースロバクター属細菌

13

から新規なクレアチニアミジノヒドロラーゼ遺伝子が単離され、遺伝子工学的技術による該酵素の製造法が確立され、高純度な該酵素の大量供給とクレアチニンの定量への利用が可能となった。また、該遺伝子を改変することにより、理化学的性質の改良された新規なクレアチニアミジノヒドロラーゼを製造する方法を導き出すことができる。

【0049】

【配列表】

14

* 配列番号：1
配列の長さ：411
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：蛋白質
起源
生物名：アースロバクター・エスピー (Arthrobacter s.p.)
* 株名：TE1826 (FERM P-10637)

配列

Met Gln Lys Ile Thr Asp Leu Glu Arg Thr Lys Val Leu His Asn Gly
1 5 10 15
Glu Lys Phe Lys Gly Thr Phe Ser Lys Ala Glu Met Asp Arg Arg Asn
20 25 30
Thr Asn Leu Arg Asn Tyr Met Ala Glu Lys Asp Ile Asp Ala Val Leu
35 40 45
Phe Thr Ser Tyr His Asn Ile Asn Tyr Tyr Ser Asp Phe Leu Tyr Thr
50 55 60
Ser Phe Asn Arg Asn Tyr Gly Leu Val Val Thr Gln Asn Lys His Val
65 70 75 80
Thr Val Ser Ala Asn Ile Asp Gly Gly Met Pro Trp Arg Arg Ser Tyr
85 90 95
Asp Glu Asn Ile Val Tyr Thr Asp Trp Arg Arg Asn Tyr Phe Tyr
100 105 110
Ala Ile Gln Lys Val Leu Glu Glu Ala Gly Val Lys Lys Ala Arg Leu
115 120 125
Gly Ile Glu Glu Asp His Val Ser Ile Asp Leu Leu Arg Lys Phe Ser
130 135 140
Asp Thr Phe Pro Asn Phe Glu Leu Val His Val Ser Gln Asp Val Met
145 150 155 160
Lys Gln Arg Met Ile Lys Ser Ala Glu Glu Ile Arg His Ile Lys Asn
165 170 175
Gly Ala Arg Ile Ala Asp Ile Gly Gly Tyr Ala Val Val Glu Ala Ile
180 185 190
Gln Glu Gly Val Pro Glu Tyr Glu Val Ala Leu Ala Gly Ser Lys Ala
195 200 205
Met Thr Arg Glu Ile Ala Lys Leu Tyr Pro Gln Ser Glu Leu Arg Asp
210 215 220
Thr Trp Val Trp Phe Gln Ala Gly Ile Asn Thr Asp Gly Ala His Ser
225 230 235 240
Trp Ala Thr Ser Lys Lys Val Gln Lys Gly Glu Ile Leu Ser Leu Asn
245 250 255
Thr Phe Pro Met Ile Ala Gly Tyr Tyr Thr Ala Leu Glu Arg Thr Leu
260 265 270
Phe Leu Glu Glu Val Ser Asp Ala His Leu Lys Tyr Trp Glu Ile Asn
275 280 285
Val Glu Val His Lys Arg Gly Leu Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala Val
290 295 300
Cys Lys Asp Ile Cys Ala Glu Leu Asn Glu Met Phe Arg Glu His Asp
305 310 315 320

15

16

Leu Val Lys Asn Arg Thr Phe Gly Tyr Gly His Ser Phe Gly Val Leu
 325 330 335
 Ser His Tyr Tyr Gly Arg Glu Ala Gly Leu Glu Leu Arg Glu Asp Ile
 340 345 350
 Asp Thr Ile Leu Glu Pro Gly Met Val Ile Ser Met Glu Pro Met Ile
 355 360 365
 Leu Ile Pro Glu Gly Gln Pro Gly Ala Gly Gly Tyr Arg Glu His Asp
 370 375 380
 Ile Leu Val Ile Gln Glu Asn Gly Val Val Glu Asp Ile Thr Gly Phe
 385 390 395 400
 Pro Phe Gly Pro Glu Tyr Asn Ile Ile Lys Lys
 405 410

【0050】配列番号：2

配列の長さ：1236

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

* 起源

生物名：アースロバクター・エスピー (Arthrobacter s p.)

株名：TE1826 (FERM P-10637)

*

配列

ATG CAA AAA ATC ACT GAT CTT GAA AGA ACA AAA GTT CTG CAC AAT GGC	48
Met Gln Lys Ile Thr Asp Leu Glu Arg Thr Lys Val Leu His Asn Gly	
1 5 10 15	
GAA AAA TTT AAA GGT ACT TTC TCA AAA GCG GAA ATG GAC CCC AGG AAT	96
Glu Lys Phe Lys Gly Thr Phe Ser Lys Ala Glu Met Asp Arg Arg Asn	
20 25 30	
ACG AAC CTG CGT AAT TAC ATG GCT GAA AAA GAT ATT GAC GCT GTC CTA	144
Thr Asn Leu Arg Asn Tyr Met Ala Glu Lys Asp Ile Asp Ala Val Leu	
35 40 45	
TTT ACT TCT TAC CAC AAT ATT AAC TAT TAC AGC GAT TTC TTA TAT ACA	192
Phe Thr Ser Tyr His Asn Ile Asn Tyr Tyr Ser Asp Phe Leu Tyr Thr	
50 55 60	
TCT TTT AAC AGG AAT TAT GGA TTG GTT ACC CAG AAC AAA CAC GTA	240
Ser Phe Asn Arg Asn Tyr Gly Leu Val Val Thr Gln Asn Lys His Val	
65 70 75 80	
ACA GTT AGT GCA AAC ATA GAT GGC GGG ATG CCT TCG AGA AGA AGC TAC	288
Thr Val Ser Ala Asn Ile Asp Gly Gly Met Pro Trp Arg Arg Ser Tyr	
85 90 95	
CAT GAA AAT ATT GTA TAC ACC GAC TCG AGA AGA GAC AAC TAT TTC TAT	336
Asp Glu Asn Ile Val Tyr Thr Asp Trp Arg Arg Asp Asn Tyr Phe Tyr	
100 105 110	
CCA ATT CAA AAA GTA CTA GAA GAA CCA GGA GTT AAG AAA CCC CGC TTA	384
Ala Ile Gln Lys Val Leu Glu Glu Ala Gly Val Lys Lys Ala Arg Leu	
115 120 125	
GGC ATT GAA GAG GAC CAT GTG TCC ATC GAT CTT CTG AGA AAA TTC TCA	432
Gly Ile Glu Glu Asp His Val Ser Ile Asp Leu Leu Arg Lys Phe Ser	
130 135 140	
GAC ACA TTT CCT AAC TTT GAA TTG GTT CAT GTT TCT CAA GAT GTT ATG	480
Asp Thr Phe Pro Asn Phe Glu Leu Val His Val Ser Gln Asp Val Met	
145 150 155 160	
AAA CAG CGG ATG ATC AAA TCT GCT GAG GAA ATT AGG CAT ATA AAA AAT	528
Lys Gln Arg Met Ile Lys Ser Ala Glu Glu Ile Arg His Ile Lys Asn	

165	170	175	
GCG GCA AGG ATT GCT GAC ATT CCC GGC TAC GCA GTT GTT GAA GCT ATT			576
Gly Ala Arg Ile Ala Asp Ile Gly Gly Tyr Ala Val Val Glu Ala Ile			
180	185	190	
CAA GAA GGT GTT CCC GAA TAT GAA GTA GCA CCT GCC GGC TCC AAG GCA			624
Gln Glu Gly Val Pro Glu Tyr Glu Val Ala Leu Ala Gly Ser Lys Ala			
195	200	205	
ATG ACT CGT GAG ATT CCC AAG CTA TAT CCG CAA TCA GAG TTA AGA GAC			672
Met Thr Arg Glu Ile Ala Lys Leu Tyr Pro Gln Ser Glu Leu Arg Asp			
210	215	220	
ACT TCG GTC TCG TTC CAG GCT CGT ATT AAT ACT GAT GGA CCT CAC ACC			720
Thr Trp Val Trp Phe Gln Ala Gly Ile Asn Thr Asp Gly Ala His Ser			
225	230	235	240
TGG GCA ACC TCC AAA AAA GTC CAA AAA CGT GAA ATT CTA ACC CTC AAC			768
Trp Ala Thr Ser Lys Lys Val Gln Lys Gly Glu Ile Leu Ser Leu Asn			
245	250	255	
ACA TTC CCG ATG ATT GCG GGT TAC TAC ACA GCG CTG GAA CGA ACT TTG			816
Thr Phe Pro Met Ile Ala Gly Tyr Tyr Thr Ala Leu Glu Arg Thr Leu			
260	265	270	
TTC TTA GAA GAA GTT TCT GAT GCC CAT CTA AAA TAT TGG GAA ATA AAC			864
Phe Leu Glu Glu Val Ser Asp Ala His Leu Lys Tyr Trp Glu Ile Asn			
275	280	285	
GTC GAA GTT CAC AAA CGC CGT CTT GAA TTA ATT AAG CCC CGT GCA GTC			912
Val Glu Val His Lys Arg Gly Leu Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala Val			
290	295	300	
TGT AAG GAT ATC TGT GAG TTA AAT GAA ATG TTC CGT GAG CAT GAC			960
Cys Lys Asp Ile Cys Ala Glu Leu Asn Glu Met Phe Arg Glu His Asp			
305	310	315	320
CTG GTT AAA AAC CGG ACG TTT CGT TAT GGC CAT TCA TTC GGA GTT CTT			1008
00u Val Lys Asn Arg Thr Phe Gly Tyr Gly His Ser Phe Gly Val Leu			
325	330	335	
TCC CAC TAC TAT GGC CGT GAA GCC GGG CTT GAG CTT CGT GAA GAT ATC			1056
Ser His Tyr Tyr Gly Arg Glu Ala Gly Leu Glu Leu Arg Glu Asp Ile			
340	345	350	
GAC ACC ATT CTC GAG CCA CGT ATG GTC ATT TCA ATG GAA CCG ATG ATC			1104
Asp Thr Ile Leu Glu Pro Gly Met Val Ile Ser Met Glu Pro Met Ile			
355	360	365	
TTG ATT CCT GAA GCA CAA CGG CGA GCC GGC GGA TAC CGC GAG CAT GAT			1152
Leu Ile Pro Glu Gly Gln Pro Gly Ala Gly Gly Tyr Arg Glu His Asp			
370	375	380	
ATC TTA GTG ATA CAA GAA AAT CGT GTC ATT GAA GAT ATT ACT GGC TTC			1200
Ile Leu Val Ile Gln Glu Asn Gly Val Val Glu Asp Ile Thr Gly Phe			
385	390	395	400
CCA TTT GGC CCT GAA TAT AAT ATT ATC AAA AAG TAA	1236		
Pro Phe Gly Pro Glu Tyr Asn Ile Ile Lys Lys			
405	410		

【0051】配列番号：3

配列の長さ：49

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：合成DNA

配列

AGGAA CCCAG GAGAT TAAGG ATCCA AAAAA TCACT GATC 49

【0052】配列番号：4

配列の長さ：39

配列の型：核酸

配列

AATGG TGAAT TACTT TTTGA TAATA TTATA TTCAG GGCC 39

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のクレアチンアミジノヒドロラーゼのア

ミノ酸配列とシュードモナス・ブチダ (Pseudomonas pu 10 tida) が產生するクレアチンアミジノヒドロラーゼのア

ミノ酸配列との比較を示す図である。

* 鎖の数：一本鎖

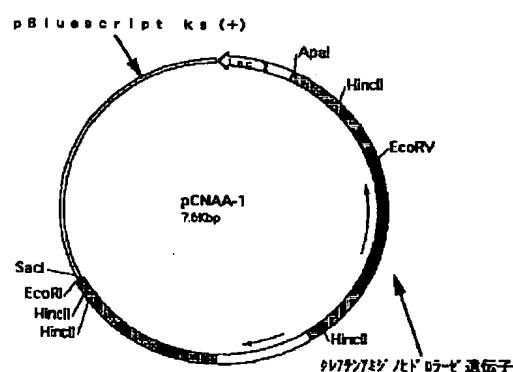
トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA

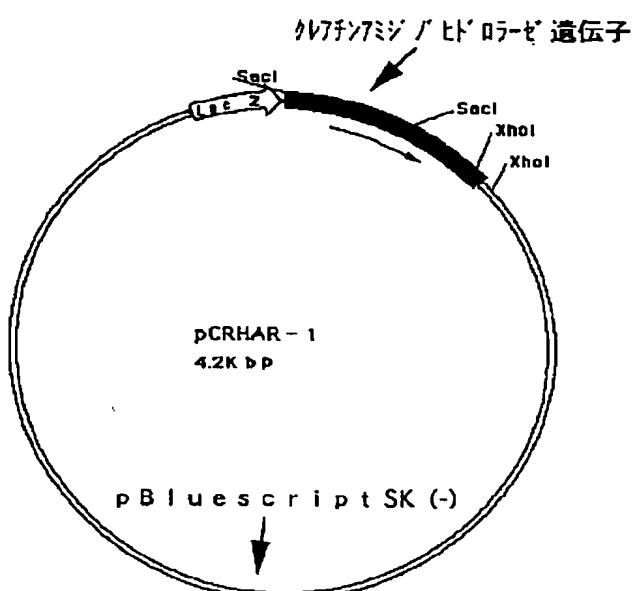
※【図2】pCNA A-1の制限酵素地図を示す図であ
る。【図3】pCRHRA-1の制限酵素地図を示す図であ
る。

※

【図2】



【図3】



[図1]

本特許 1' MQKITDLERTKVHLNGEKFKGTFSKAEMDRRNTNLRNMAEKDIDAVLJETSYHNINYYSDFLYTSFNRNYGLVVTQNKHV
 1" MQMPKTLRIRNGDKVRSTWSAQEYANQARLAHLAAENIDAIFIPTSYHNINYYSDFLYCSGRPYALVVTQDDVI

本特許 81' TVSANIDGQMPWRRRSXD-ENIVYTDMRDRDNYFYAIQKVLEEEAGVKKARIGLEEDHVSIDLLRKFSDTFPNTELVHVSQDV
 77" SISANIDGQWPWRRRTVGTDNIVYTDMQRDNYFVAIQQAL---PKARRIGIEHDHNLNQNRDHLAARYPDAELVDVAAC

本特許 160' MKQRMKSAEIRHIKNGARIADIGGYAVVEAIQEGVPHYEVALAGSKAMTREIAKLYPQSELRLDTWVWFOAGINTDGAH
 153" MRMRMKSAEHWVIREGARIADIGGAAVTEALGDQVPEYEVALHTQAMVRAIADTFFEDVELLDTWVWFOQSGINTDGAH

本特許 240' SWATSKKVQKGELLSLNTEPPMIAGYYTALERLTLFLEEVSDAHLKYWEINVEVKRGLELIKPGAVCKDICAELNEMFRH
 233" NPVTTRKVNKGDLISLNCPMIAGYYTALERLTLFDDHCSDDERLWQVNVEVHEAGLKLLIKPGARCSDIAREELNEIFLKH

本特許 320' DLVKKNRTFGYGHSGFGVLSHYGREAAGLELREDITILEPGMVISMEPMILIPEGQPGAGGYREEDILVIQENGVVEDITG
 313" DVLQYRTFGYGHSGFGTSLHYGREAAGLRLREDITILEPGMVVSMEPMIMLPBGLPPAGGYREHDILIVNENG-AENITK

本特許 400' FPFGEPEYNIKK
 392" FPYGPEKNIIRK

フロントページの続き

(51)Int.Cl.*	識別記号	F I
C 12 R 1:06)		
(C 12 N 1/21		
C 12 R 1:19)		
(C 12 N 9/80		
C 12 R 1:06)		
(C 12 N 9/80		
C 12 R 1:19)		